

01/13/00



EXPRESS MAIL NO. EL233435495US

A

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Application of Ralf Reiner Schumann and Norbert Lamping

Filed on January 13, 2000

For THERAPEUTIC AGENT FOR THE TREATMENT OF SEPTICAEMIA, ITS
PREPARATION AND USE

Attorney's Docket 0107-020P/GPK



BOX PCT - NO FEE

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks
Washington DC 20231

RECEIVED
JAN 20 2000
OIPE/JCWS

Sir:

NEW PATENT APPLICATION

Enclosed herewith under 35 U.S.C. 111 is a continuation of International
Application No. PCT/DE98/00964, filed on April 4, 1998.

This application comprises an abstract, 7 pages of specification (in German), 11
claims, and 7 sheets of drawings.

The priority of German patent application No. 197 29 810.9, filed on July 11,
1997 (and then as International application No. PCT/DE98/00964), is hereby claimed,
the contents of which are incorporated herein by reference thereto. A certified copy
will be filed in due course.

The filing fee and all other documents, including the English translation, will be
filed later.

Schweitzer Cornman Gross & Bondell LLP
230 Park Avenue, Suite 2200
New York, New York 10169
(212) 986-3377 Phone
(212) 986-6126 Fax

Respectfully submitted,

Gabriel P. Katona
Attorney for Applicant
Registration No. 20,829

Applicant: R. R. Schumann et al

Serial No.: N/A

Filed: January 11, 2000

For: THERAPEUTIC AGENT FOR THE TREATMENT OF SEPTICAEMIA, ITS PREPARATION
AND USE

CLAIM FOR SMALL ENTITY STATUS

I hereby declare that I am an official empowered to act on behalf of the following *nonprofit* organization:

Name of Organization: Max-Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin

Address: Robert-Rössle Straße 10, 13125 Berlin, Germany

I hereby declare that the aforementioned organizationm would qualify as tax exempt under the Internal revenue Service Code (26 USC 501(a) and 501 (c)(3)) if it would be located in the United States of America, and no rights in and to the above-identified application or patent have been assigned or licensed to, and that there is no obligation to license or to assign such rights to, any organization that, together with any and all of its affiliates, had more than 500 full- and part-time employees within the last 12 months.

The duty is acknowledged in this application and in any patent to issue thereon, to notify any change in status resulting in loss of entitlement to small entity status, prior to paying, or at the time of paying, the earliest of the issue fee or any maintenance fee due after the date of which status as a small entity is no longer appropriate.

I hereby declare further that all statements made herein of his own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application, any patent issuing thereon, or any patent to which this declaration applies.

Jan. 20, 2000

Name: Prof. Dr. D. Ganten Dr. H.-J. Seehrich

Schweitzer Cornman Gross & Bondell, LLP, 230 Park Avenue, New York 10169 USA

Title: _____
Scientific Director Admin. Director



Mittel zur Sepsistherapie, seine Herstellung und seine Verwendung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Sepsistherapie, seine Herstellung und seine Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie und die Medizin.

Die Sepsis mit ihren häufig letalen Komplikationen gehört zu den am meisten gefürchtetsten und therapeutisch nicht beherrschbaren Krankheitsbildern in der Medizin und fordert jährlich mehrere 100.000 Todesopfer allein in den westlichen Ländern. Es muß dringend nach neuen Behandlungsmöglichkeiten gesucht werden, da Antibiotika zu langsam wirken und die Freisetzung bakterieller Toxine nicht verhindern, sie z.T. sogar verstärken. Die durch bakterielle Toxine ausgelöste Ausschüttung von Botenstoffen (Zytokine) durch den Wirtsorganismus ist das wichtigste Element der pathogenetischen Kaskade in der Entstehung des Krankheitsbildes der Sepsis. Verschiedene neue therapeutische Ansätze, zum Einen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) als wichtigstes Toxin durch Antikörper zu blockieren oder die körpereigenen, sogenannten proinflammatorischen Zytokine zu antagonisieren versagten in großen klinischen Studien vollständig (C. Natanson et al., Ann. Intern Med. 120, 771-783 (1994)).

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Sepsistherapie zu entwickeln.

Diese Aufgabe wird durch ein Mittel gelöst, das als wesentlichen Bestandteil das Lipopolysaccharid Bindende Protein LBP enthält.

WO 99/02178

2

PCT/DE98/00964

Die Merkmale der Erfindung sind in den Ansprüchen 1-11 enthalten. Neben dem humanen LBP kann auch murines oder Kaninchen-LBP eingesetzt werden.

Die Struktur von LBP ist bekannt, seine Gewinnung erfolgt durch Isolierung eines Klon aus einer Akutphase cDNA Genbank, sowie anschließender Sequenzierung und Ableitung der Aminosäuresequenz. Rekombinantes LBP wird durch Klonierung der cDNA in einen Expressionsvektor sowie Ko-Infektion von Insektenzellen mit dem Baculovirus hergestellt.

Das klonierte LPS Bindende Protein (LBP) bindet hochaffin LPS und wird während der Sepsis als Akutphaseprotein ins Serum ausgeschüttet. Wie in den Ausführungsbeispielen gezeigt wird, hemmt LBP die LPS-Wirkungen und kann, wenn es Mäusen gegeben wird, die durch LPS ausgelöste Sepsis unterdrücken und die Letalität hochsignifikant reduzieren. Dies gilt bei Einsatz gleichzeitig mit der Auslösung der Sepsis, sowie vorher, was LBP für eine Sepsisprophylaxe geeignet erscheinen läßt. Da LPS auch bei der durch grampositive Bakterien ausgelösten Sepsis, sowie bei dem 'systemic inflammatory response syndrome', einem durch Trauma ausgelösten, der Sepsis identischen Krankheitsbild, durch 'Translokation' gramnegativer Darmbakterien eine zentrale Rolle spielt, kann die Hemmung der LPS-Effekte durch LBP auch diese dramatischen Krankheitsbilder verbessern.

Neben dem hochaktiven rekombinanten LBP sind für die Realisierung der Erfindung gleichermaßen geeignet funktionsveränderte und optimierte Mutanten, die ebenfalls als Sepsistherapeutikum eingesetzt werden.

Eine weitere grundlegende Möglichkeit zur Realisierung der Erfindung besteht darin, das klonierte LBP-Gen in einen adenoviralen Vektor mit hoher Leberaktivität hinter den starken

CMV-Promoter zu klonieren, um so einen Gentransfer nebst hepatischer Expression von LBP zu erreichen.

Die Erfindung ist anwendbar bei

- Sepsis ausgelöst durch gramnegative Bakterien
- Sepsis ausgelöst durch grampositive Bakterien
- Systemic inflammatory response syndrom (SIRS), ausgelöst durch Trauma und Verletzung

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel und Abbildungen näher erläutert werden.

Die Gewinnung von LBP

Die komplette LBP cDNA wird in den pACHLT-B Vektor (Pharmlingen, San Diego, USA) hinter den starken Polyhedrinpromoter und hinter die Glutathion S-Transferase (GST) cDNA kloniert, so daß ein GST-Fusionsprotein exprimiert wird. Es wird dann eine 500 ml Zellkultur von Sf-9-Insektenzellen mit diesem Vektor und der Baculovirus DNA ('Baculogold', Baculovirus DNA in linearisierter Form, ebenfalls von Pharmlingen, San Diego, USA) infiziert. Die Zellen werden nach 2 Tagen lysiert und das Lysat wird im 'batch'-Verfahren an Glutathion-Sepharose in Gegenwart von Triton X-100 gekoppelt. Durch Thrombinverdau wird dann LBP vom Fusionspartner abgespalten, gefolgt von einer Behandlung mit Calbiosorb zur Triton-Entfernung und einer Behandlung mit Benzamidin-Sepharose zur Entfernung von Thrombinresten. Die resultierenden Konzentrationen von reinem LBP betragen 0,3 - 0,5 mg/ml.

Doc. T. 43 30 34832271

Legenden zu den Abbildungen

Abbildung 1: Eine murine Makrophagenzelllinie wird mit verschiedenen Konzentrationen des bakteriellen Toxins LPS in vitro zur Synthese des Sepsismediators TNF in Abhängigkeit von LBP stimuliert. Bei hohen, im Organismus nicht vorkommenden LPS-Konzentrationen beeinflusst LBP die TNF-Synthese nicht. Die Stimulation der Makrophagen durch niedrigere LPS-Mengen wird jedoch durch hohe LBP-Konzentrationen, wie sie während der Akutphase in vivo vorkommen und auch durch exogene Zugabe erzielt werden können, gehemmt.

Abbildung 2: Hier zeigt sich, daß die Zugabe von LBP in der Gegenwart von Serum ebenfalls die TNF-Produktion der Makrophagenzelllinie unterdrückt. Hierfür ist das im Serum befindliche LBP verantwortlich.

Abbildung 3: Wird die Serumkonzentration bei konstanter exogen zugeführter LBP-Menge erhöht, wird ebenfalls die TNF-Synthese unterdrückt.

Abbildung 4: Hier wird gezeigt, daß die LBP-Spiegel der Maus, die durch exogene Gabe erzeugt werden, den Akutphasespiegeln, die durch hohe LPS-Gabe erzeugt werden, entsprechen und somit physiologisch sind.

Abbildung 5: In der Maus kann durch gleichzeitige Gabe von LBP die LPS-induzierte Zytokinausschüttung unterdrückt werden. A: TNF, B: IL-6.

Abbildung 6: Desweiteren wird der durch LPS ausgelöste und durch den Anstieg des ALT-Enzym erfaßte Leberschaden durch die gleichzeitige Gabe von LBP unterdrückt.

Abbildung 7: Die Gabe von LBP reduziert signifikant die Letalität in einem LPS-Sepsismodell, durchgeführt mit 20 Mäusen pro Gruppe.

Kurze Interpretation:

Hochdosiertes LBP unterdrückt in vitro die durch das bakterielle Toxin LPS ausgelöste Synthese eines wichtigen Sepsismediator-moleküls, nämlich TNF. Die Produktion dieses Proteins und anderer Mediatoren wird in der Maus bei gleichzeitiger LBP-Gabe ebenfalls unterdrückt. Desweiteren wird der durch die LPS-Gabe induzierte Leberschaden durch LBP verhindert und die Überlebenszahl der Mäuse signifikant erhöht. Die Gabe von LBP scheint also vor den LPS-Effekten in der Sepsis zu schützen und stellt somit ein neues therapeutisches Prinzip zur Behandlung der Sepsis dar.

1. Mittel zur Sepsistherapie, enthaltend das Lipopolysaccharid Bindende Protein (LBP), seine Varianten, Mutanten oder Hybridproteine

3. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend murines LBP

5. Mittel nach Anspruch 1, enthaltend die Hybridproteine LBP mit der LPS-Bindungsstelle des Bactericidal/permeability increasing proteins (BPI) bzw. LBP mit der LPS-Bindungsstelle des Limulus anit-LPS-Faktors (LALF)

7. Verfahren zur Herstellung des Mittels nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß im Baculovirussystem, sowie in CHO-Zellen LBP zunächst als Fusionsprotein exprimiert und dann durch den Fusionspartner mittels an sich bekannter Trennverfahren aufgereinigt wird

9. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-6a zur Therapie der durch grampositive Bakterien ausgelösten Sepsis

WO 99/02178

PCT/DE98/00964

7

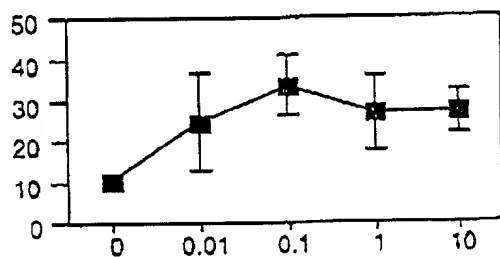
10. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-6a zur Therapie des durch Trauma und Verletzung ausgelösten SIRS.

11. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das LBP-Gen in einen adenoviralen Vektor hinter einen starken Promoter, vorzugsweise den CMV-Promoter, kloniert wird und anschließend ein Gentransfer in die betroffenen Leberzellen durchgeführt wird

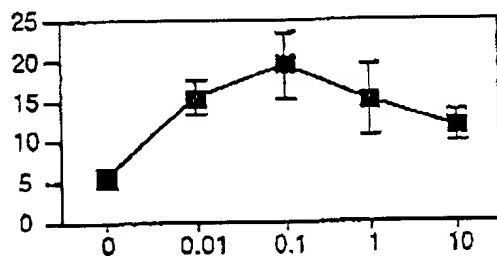
10/01/2000 13:37 +49 30 94892271

1 / 7

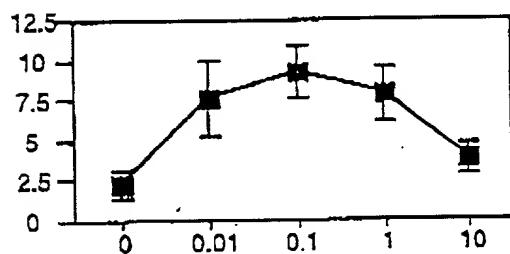
TNF- α (ng/ml)



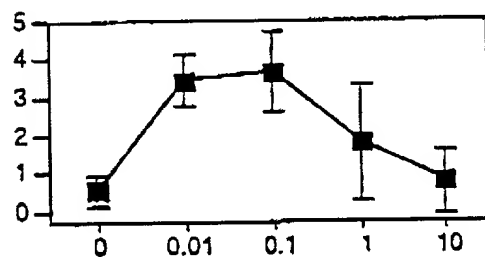
3 ng/ml LPS



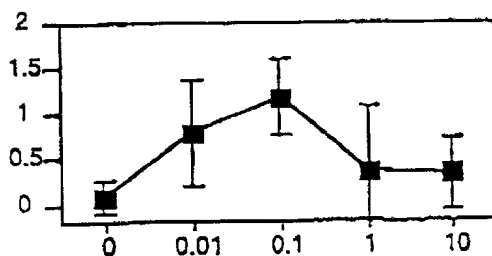
1 ng/ml LPS



0.33 ng/ml LPS



0.11 ng/ml LPS



0.037 ng/ml LPS

mLBP (μ g/ml)

Fig.1

2 / 7

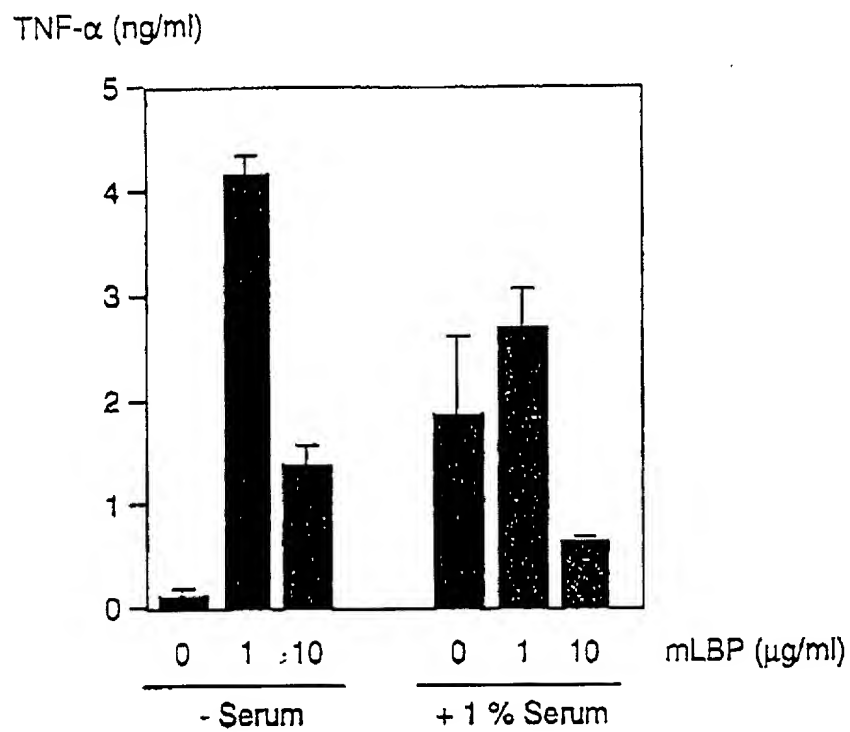


Fig.2

3 / 7

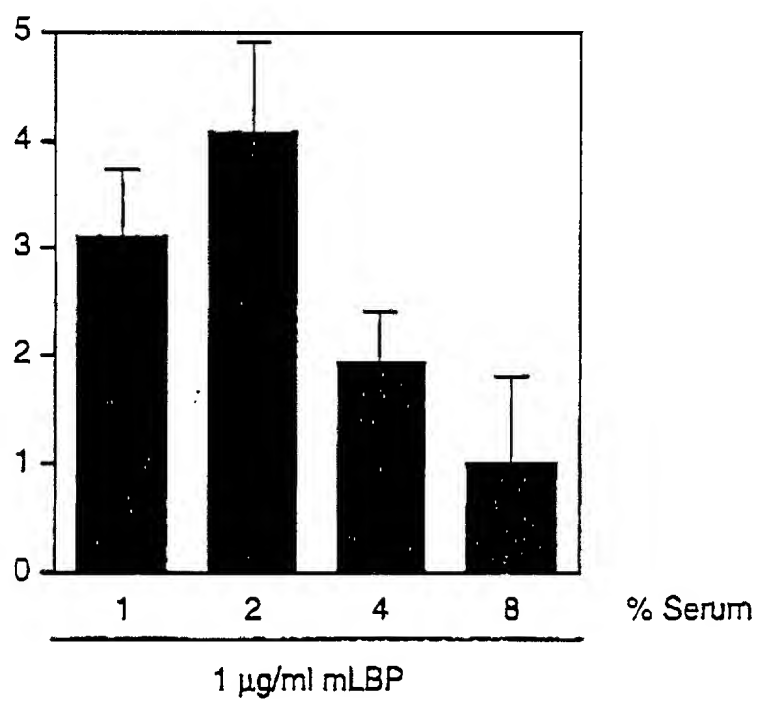
TNF- α (ng/ml)

Fig.3

WO 99/02178

PCT/DE98/00964

4 / 7

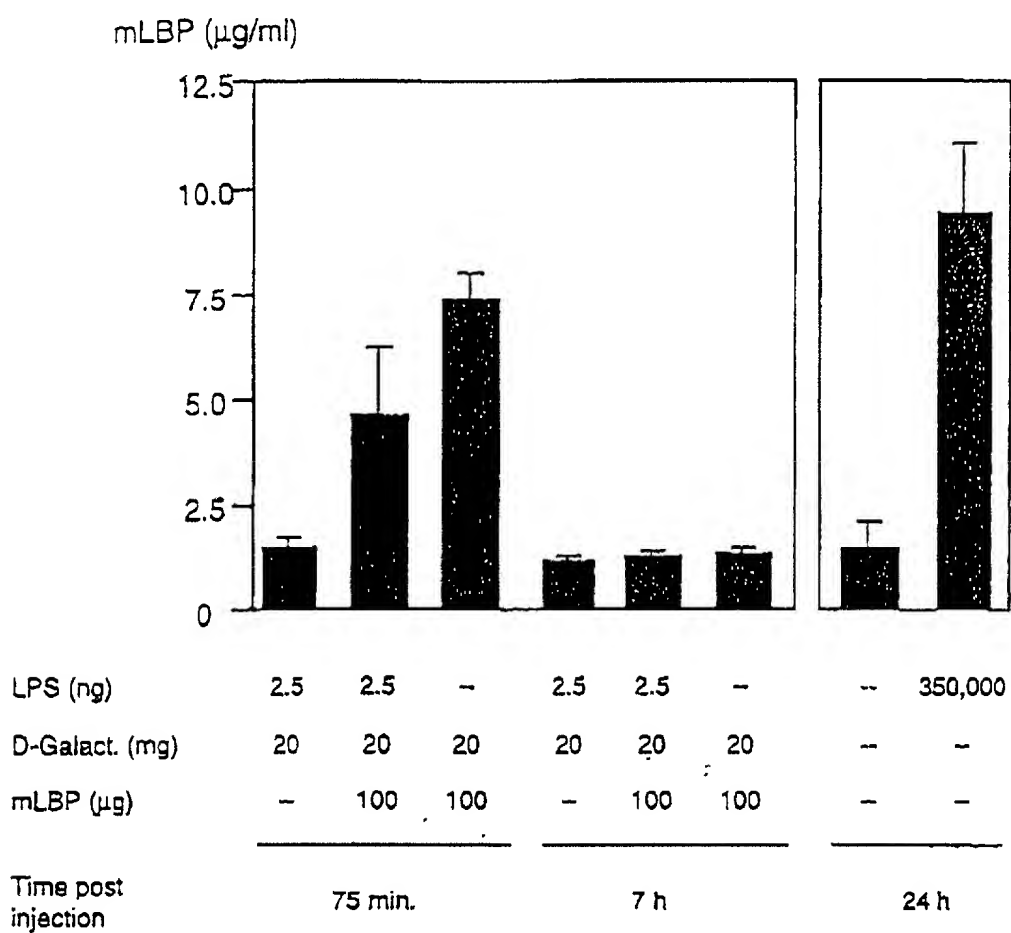


Fig. 4

5 / 7

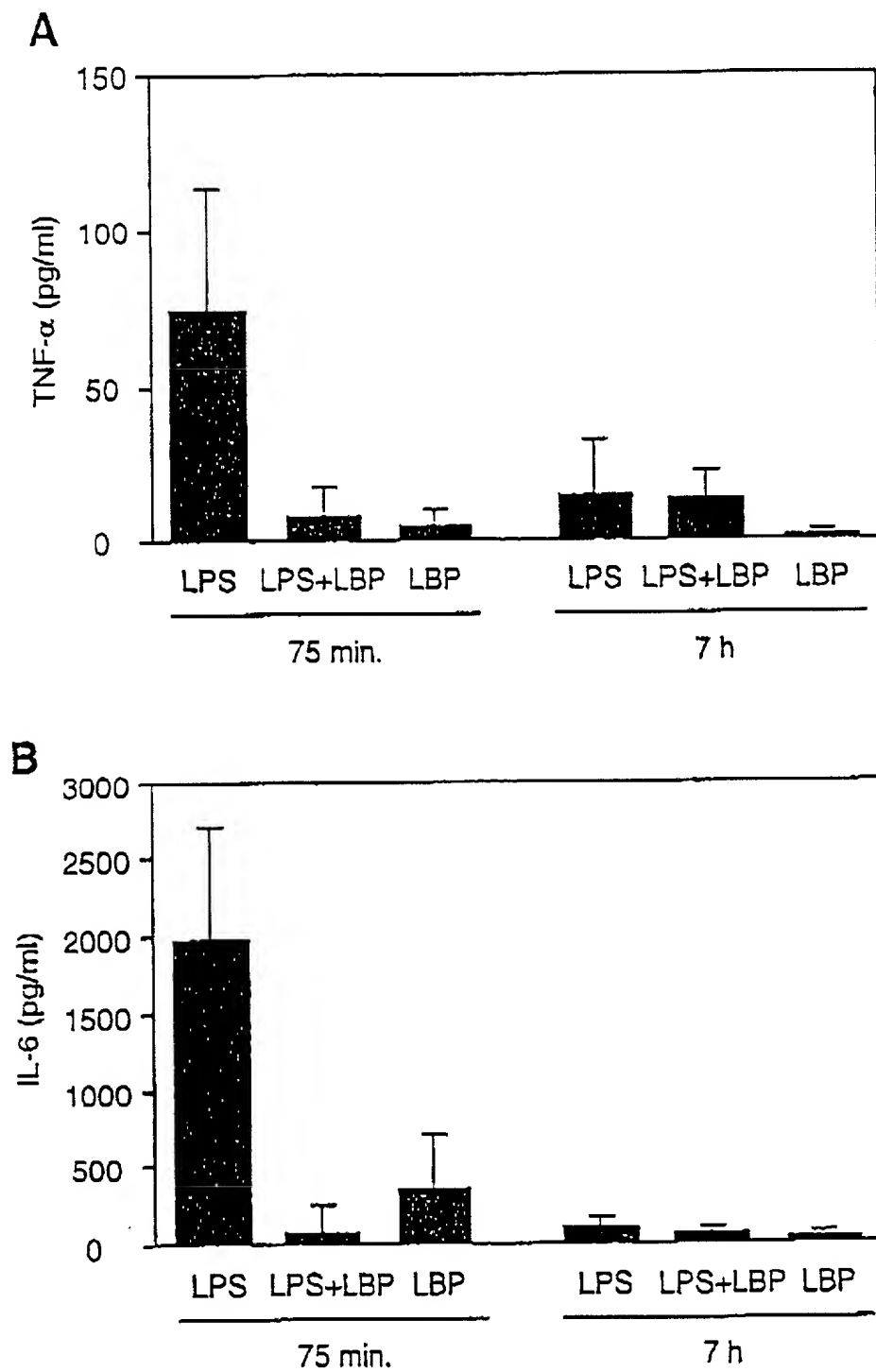


Fig. 5

6 / 7

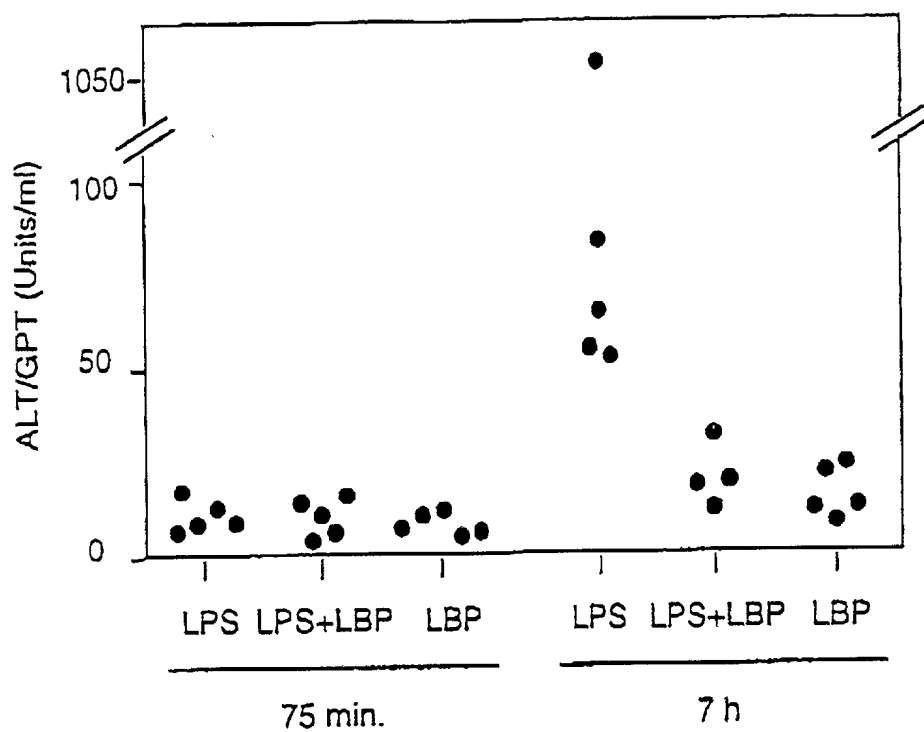


Fig. 6

7 / 7

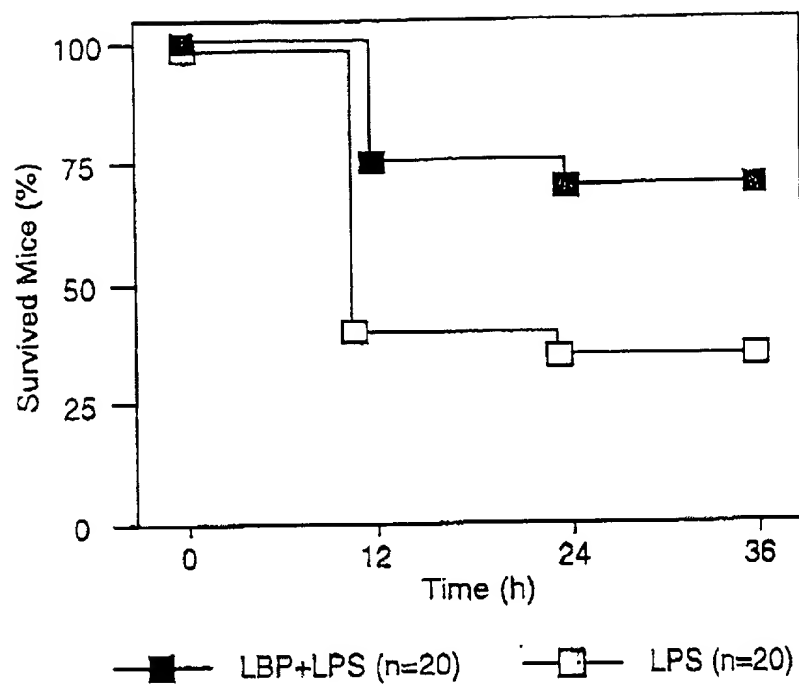


Fig. 7